

原 著 感染部位に移動したエフェクター T 細胞は メモリー T 細胞としてリンパ組織で維持される

昭和大学医学部微生物学講座

畑 明 宏 田中 和生

京都大学大学院医学研究科次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点

戸村 道夫

要約：ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞はウイルス感染が起こると増殖し、感染細胞の排除と共にその数を収縮して行く。これらの期間はそれぞれ増殖期、収縮期と呼ばれる。その後、一部のウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞はメモリー T 細胞として維持され、再感染に備えている。このエフェクター細胞からメモリー T 細胞への分化・維持には抗原やサイトカインが重要であることが分かっているが、全身を移動している T 細胞がいつ、どこでこのような刺激を受けているかほとんど分かっていない。そこでわれわれは、ウイルス感染後の T 細胞増殖、収縮期において抗原と炎症性サイトカインの豊富な感染部位とメモリー T 細胞維持期におけるメモリー T 細胞の動態に着目し、感染部位が CD8 陽性 T 細胞に与える影響とメモリー T 細胞維持期における所属リンパ節のメモリー T 細胞の動きについて調べた。実験には紫色の光によって細胞を標識できる Kaede マウス、リンパ系細胞が細胞周期に応じて発色する Fucci マウス、卵白アルブミン (Ovalbumin, OVA) 特異的 T 細胞レセプター (TCR) を持つ RAG2-KO/OT-I マウス、感染すると OVA を感染細胞で発現するワクチニアウイルス (VV-OVA) を用いた。はじめに、ウイルス感染部位 (皮膚) から OVA 特異的 CD8 陽性細胞 (OT-I 細胞) がリンパ節に移動するか調べた。感染から 7 日目に感染部位に浸潤していた OT-I 細胞は 24 時間後に約 50% 以上が入れ替わり、これら感染部位に浸潤していた OT-I 細胞は所属リンパ節をはじめ全身の組織内で観察された。しかし感染 15 日目になると感染部位にいる OT-I 細胞は入れ替わりも移動もほとんど観察できなくなった。感染 7 日目に感染部位から所属リンパ節に移動した OT-I 細胞は所属リンパ節に存在する他の OT-I 細胞よりも T 細胞の維持に関与するサイトカインの受容体である IL17R (CD127) や IL-15R α の発現が高かった。感染 6 日目から 8 日目に感染部位を経由する OT-I 細胞は所属リンパ節、脾臓、肝臓と肺組織内に存在する OT-I 細胞の約 10% を占めた。これら感染部位から移動した OT-I 細胞は 22 日目においても各組織で観察できた。即ち、感染部位のウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞の一部は所属リンパ節を介して、全身に再循環している事が分かった。また感染部位から所属リンパ節に移動したウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞はメモリー T 細胞としての表面マーカーを有しており、メモリー T 細胞として長期間維持される事が示唆された。従って、メモリー T 細胞の形成において、感染部位は T 細胞にメモリー T 細胞としての維持に必要なサイトカイン受容体の発現を誘発させている事が示唆され、またメモリー T 細胞維持期においてメモリー T 細胞はリンパ節間を移動することにより、その維持に必要な刺激を受け取る事が出来ると考えられた。

キーワード：メモリー T 細胞, ウイルス感染

CD8 陽性 T 細胞はウイルス感染防御における主要な免疫細胞である。ウイルスが身体に感染するとウイルス特異的ナイーブ CD8 陽性 T 細胞は抗原刺激によってエフェクター T 細胞に分化し増殖し、感染細胞を特異的に認識して破壊する。感染細胞が

生体内から排除された後、ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞の一部はメモリー T 細胞として維持され、再感染時には素早く応答する事でウイルスから身体を守っている。

メモリー T 細胞は CD62L (L-selectin) とケモカイ

ン受容体 CCR7 の発現によって、CD62L^{high} CCR7^{high} のセントラルメモリー T 細胞 (TCM) と CD62L^{low} CCR7^{low} のエフェクターメモリー T 細胞 (TEM) の 2 種類に分類されてきた¹⁾。しかし近年、新たに TCM と TEM とは異なる特徴を持つ CD62L^{low} CD103 陽性のレジデントメモリー T 細胞 (TRM) が分類された²⁾。これらメモリー T 細胞サブセットは機能や局在が異なり、TCM は主に二次リンパ組織と骨髄に存在し、TEM は主に脾臓の赤色髄と数は少ないがリンパ節内や肝臓などの末梢組織に存在している。TRM は皮膚、腸や膈の上皮、唾液腺と肺気道など末梢組織に多く存在が確認されている³⁾。

メモリー T 細胞の分化には、ウイルス感染後の T 細胞増殖、収縮期に受けるサイトカイン (特に IL-7, IL-15) の濃度や抗原提示細胞が提示する抗原の量が重要であると考えられている^{4,5)}。また TRM の分化誘導には感染経路が重要であり、ワクチニアウイルス (VV) 感染においては腹腔から感染させる全身感染モデルでは誘導されず、皮膚スクラッチ (s.s.) による皮膚感染させることで皮膚に TRM が誘導される⁶⁾。このように、メモリー T 細胞の分化にはいろいろなシグナルが関与しているが、感染する組織によってシグナルの質が異なる事が考えられる。そして感染部位には抗原や炎症性サイトカインが多く存在している。以前、われわれは炎症状態の皮膚から移動してきた制御性 T 細胞が皮膚炎症の終息に重要な役割を果たすことを証明した⁷⁾。この研究は炎症状態の皮膚内の環境が、炎症を終息させる抑制性 T 細胞の教育を行っていることを示唆している。このように皮膚などの末梢組織の微小環境は制御性 T 細胞の育成や TEM の維持に必要なシグナルを与えており、CD8 陽性 T 細胞においてもこれら微小環境がメモリー T 細胞の分化に重要な役割を担っていると考えられる。

しかし、これら感染部位である皮膚を経由した CD8 陽性 T 細胞を特定する事は難しい。また、一般的に活性化して皮膚等の末梢組織に浸潤した CD8 陽性 T 細胞の多くはその場で死ぬと考えられ、リンパ節に移動する事は想定されていない⁸⁾。そのため、これら末梢組織がメモリー T 細胞の分化に与える影響は分かっていなかった。

メモリー T 細胞の維持は、主に IL-7 と IL-15 などのサイトカインが重要であると考えられている。

これらのサイトカインは免疫細胞による産生が確認されているが、ストローマ細胞や上皮細胞なども産生しており^{9,10)}、近年メモリー T 細胞の維持においてこれらの非免疫系の細胞の役割が重用視されはじめて来た。メモリー T 細胞が非免疫系細胞からシグナルを受け取るにはメモリー T 細胞自身が動く必要がある。このことから、メモリー T 細胞はリンパ節間を常に移動し各組織で生存あるいは各メモリーフェノタイプを維持するシグナルを受けている事が考えられる。しかし、このメモリー T 細胞維持期におけるリンパ節間のウイルス特異的メモリー T 細胞の動態は分かっていない。

Kaede マウスは、全身の細胞で緑色の蛍光タンパク質 Kaede を発現している。この Kaede タンパク質は紫色の光によって緑色 (Kaede Green) から赤色 (Kaede Red) に光変換させる事が出来る。即ち、皮膚にウイルスを感染させた Kaede マウスの感染皮膚に光を当てると、光が当たった細胞は Kaede Red に光変換するため、皮膚内の細胞をマーキングする事が出来る。そして、皮膚に光を当て一定時間後に所属リンパ節内の Kaede Red 陽性細胞を調べることで、皮膚からどのような細胞が動いてきているか知ることができる⁷⁾。また Kaede マウスのリンパ節に光を当て、任意の時間経過後にリンパ節内の Kaede Red 陽性細胞の割合を調べることでリンパ節内の細胞がリンパ節外に移動する速度を測定することができる¹¹⁾。

ワクチニアウイルス (VV) の皮膚感染モデルは、皮下感染や全身感染モデルよりも効率よくメモリー T 細胞を誘導することができ、皮膚内に TRM を誘導することができる¹²⁾。

今回、われわれはウイルス感染部位がメモリー T 細胞の分化に与える影響とメモリー T 細胞維持期におけるウイルス特異的なメモリー T 細胞の動態を調べるために、Kaede マウスと VV の皮膚感染モデルを用いて実験を行った。

研究方法

動物実験は京都大学動物実験委員会承認のもと「昭和大学動物実験実施指針」に準じてに行った。

1. マウスと飼育

C57BL/6 (B6) マウスは日本クレア、CD45.1 マウスは Jackson Laboratory, Rag2-KO, OT-I マウス

ス は Taconic から購入した。CD45.1 マウスは B6 (CD45.2) マウスのコンジェニックマウスで、B6 マウスに CD45.1 マウスの細胞を移入することで、宿主細胞と移入細胞を区別する事ができる。

Rag2KO/OT-I マウスは OVA に特異的な T 細胞受容体 (TCR) を強制発現させた CD8 陽性 T 細胞 (OT-I 細胞) が産生されるように遺伝子組み換えされたマウスで、このマウスから分離した CD8 陽性 T 細胞はすべて OVA 特異的 T 細胞 (OT-I 細胞) になる。

Kaede マウス¹¹⁾は B6 マウスと 20 回以上戻し交配し、実験に用いた。Fucci マウス¹³⁾は B6 マウスと 10 回以上戻し交配し、実験に用いた。Kaede/CD45.1/OT-I/Rag2KO マウスは CD45.1 マウス、Rag2KO/OT-I マウス、Kaede マウスを掛け合わせて作製した。Fucci/CD45.1/OT-I/Rag2KO マウスは CD45.1 マウス、Rag2KO/OT-I マウス、Fucci マウスを掛け合わせて作製した。

2. ウイルスと感染

組み換え VV-OVA¹⁴⁾は P. Marrack (University of Colorado, Denver, CO) から寄与された。尾の付け根の毛を 1.5 cm × 1 cm 剃り、毛を剃った皮膚に 1×10^5 PFU/20 μ l のウイルス溶液を塗り、27G の針で 30 回引っ搔いてウイルスを感染させた。

3. リンパ球の分離と移入

移入する CD8 陽性 T 細胞は、Kaede もしくは Fucci/Rag2KO/CD45.1/OT-I マウスの脾臓とリンパ節をプールした後 biotin 標識抗マウス Ter119, CD4, CD11b, CD11c, CD49b, B220 抗体で染色後、抗 biotin-Micro Beads によって染色し、autoMACS (Miltenyi Biotec) を用いたネガティブセレクションによって分離した。分離した Kaede もしくは Fucci/CD45.1/OT-I 細胞 (1×10^6 個) は、ウイルス感染の 24 時間前に B6 マウスに静脈注射により移入した。

4. Kaede マウスを用いた皮膚内及びリンパ節内細胞の光変換

Kaede タンパク質は紫外線～紫色 (435 nm 付近) の光を当てると緑色から赤色に変色する光変換蛍光タンパク質である。Kaede マウスはこの Kaede タンパク質を全身で発現している。Kaede マウスの皮膚に紫色の光を照射すると緑色の蛍光を発していた皮膚は赤色の蛍光を発するようになる (図 1)。

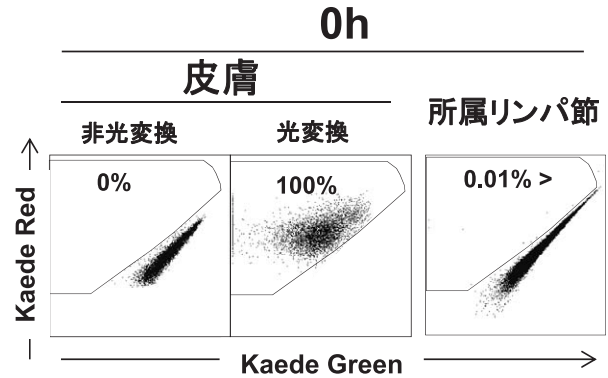


図 1 カエデマウスの光変換

カエデマウスの腹部の毛を剃り、腹部の皮膚に 435 nm の光を 10 分間当てた。

光照射前の皮膚にいるリンパ球 (左)、光照射直後の光照射した皮膚にいるリンパ球 (中央) と皮膚への光照射直後の所属リンパ節内のリンパ球 (右) を示す。各々、フローサイトメーターによって解析した。

赤色に変わった皮膚内のリンパ球はフローサイトメーターによる解析で赤色のシグナルを確認する事ができる。

鼠径リンパ節または皮膚内に存在するリンパ球の Kaede タンパク質を光変換するために 435 nm の光を 10 分間照射した ($60\text{J}/\text{cm}^2$, 光照射器 Spot UV curing equipment [SP500] (Usio, Tokyo, Japan)). 鼠径リンパ節の光照射は麻酔下で腹部の中央の皮膚を切開し、リンパ節を露出させた後、リンパ節以外の組織には光が当たらないようにアルミホイルでカバーし、組織が乾燥しないように 37℃ に暖めた PBS を滴下しながら光照射した。

5. 組織内リンパ球の分離

切除した皮膚から皮膚と脂肪組織に分離後、それぞれ 0.25% トリプシン DMEM 培養液を加え 30 分間 37℃ で処理し、処理後ハサミで切り刻んだ。切り刻んだ組織片を 0.016% ヒアルロニダーゼ、0.012% コラゲナーゼタイプ II, 0.001% DNase I, 10% FCS の DMEM 培養液に入れ 1 時間半 37℃ で処理した。処理された細胞は、リンホライト M を用いてリンパ球を分離した。

6. 染色

単細胞浮遊液を、Fc レセプターをブロするため 2.4G2 ハイブリドーマの培養上清で処理後、PE-Cy7-, allophycocyanin-, allophycocyanin-Cy7- と Brilliant Violet 421™ 標識抗マウス CD8, CD25, CD43,

CD45.1, CD45.2, CD62L, CD103, CD122, CD127, IL-15R α , CCR5, Gr-1 抗体 (BD Pharmingen, eBioScience, BioLegend) によって染色した. 染色したサンプルは LSRFortessa (BD Pharmingen) を用いて測定した. FACS データは FlowJo を用いて解析した.

結 果

1. VV-OVA 皮膚感染後の抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞増殖と感染部位への浸潤

ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞は数が少なく特定する事は容易ではない. そこで, モデル抗原として良く用いられる OVA を感染細胞で発現するように遺伝子組み替えされた VV-OVA と OT-I 細胞を実験に用いた. OT-I 細胞は OVA に特異的 T 細胞受容体 (TCR) を強制発現させた CD8 陽性 T 細胞で, OT-I/Rag2-KO マウスから分離した CD8 陽性 T 細胞はすべて OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞 (OT-I 細胞) になる. この実験モデルは抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞応答を簡易的に観察する事ができるため多くの実験で用いられて来た. 今回われわれは, B6 マウスに移入した OT-I 細胞の応答を観察する事で VV-OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の応答を観察した. また, 移入した OT-I 細胞と宿主細胞を区別するために CD45.1 マウスを用いた.

はじめに, VV-OVA 皮膚感染モデルにおける OT-I 細胞の細胞増殖のタイムコースを調べるために, Fucci マウスと CD45.1 マウスを交配させ Fucci/OT-I/CD45.1 マウスを作成した. Fucci マウスの免疫細胞は, 細胞周期が S/G₂/M 期では mAzami Green 陽性になり, G₁ 期には Kusabira Orange2 が発現する (図 2a)¹³⁾. 作成した Fucci/OT-I/CD45.1 マウスから CD8 陽性細胞を分離し B6 マウス (CD45.2) に移入し, VV-OVA を皮膚感染させた. そして, 所属リンパ節である鼠径リンパ節内の Azami Green 陽性 OT-I 細胞の割合と OT-I 細胞数を CD45.1 をマーカーにして調べた (図 2b). 所属リンパ節において, 感染 3 日目には約 50% の OT-I 細胞が Azami Green 陽性であった. よって約 50% の OT-I 細胞が S/G₂/M 期にあることが分かった (図 2b). S/G₂/M 期の OT-I 細胞数は感染 4 日目をピークに減少し, 感染 7 日目に S/G₂/M 期にある OT-I 細胞は約 5% まで減少した. OT-I 細胞の細胞数は感染 5 日目をピー

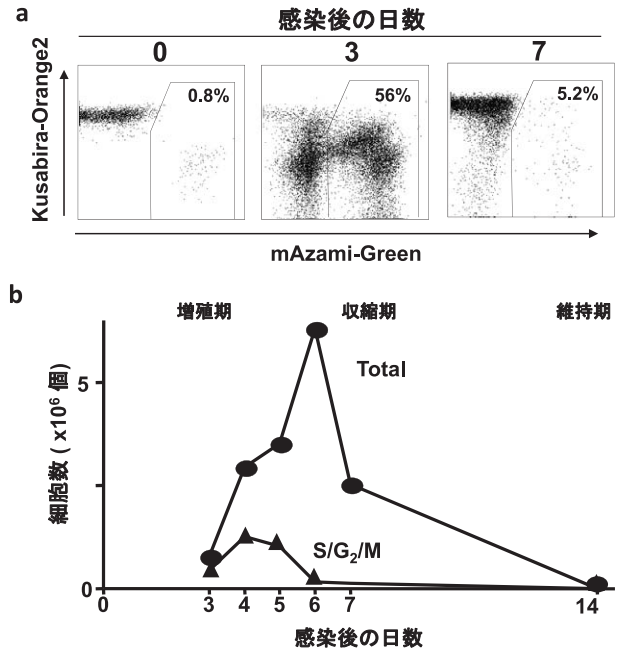


図 2 VV-OVA 皮膚感染モデルにおける抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の増殖タイムコース

- a: Fucci マウスのリンパ球は S/G₂/M 期には黄色から緑色 (mAzami Gree) になり, G₁ 期には無色から赤色 (Kusabira Orange2) になる. B6 マウスに OT-I/Fucci/CD45.1 マウスから分離した CD8 陽性 T 細胞を 1×10^6 個を移入した. CD8 陽性 T 細胞を移入して 24 時間後に, 尾の付け根付近の毛を剃り, 毛を剃った皮膚に VV-OVA (1×10^5 PFU) をスクラッチングによって感染させた. VV-OVA 感染後の所属リンパ節内の細胞を抗 CD45.1 抗体, 抗 CD8 抗体で染色しフローサイトメーターによって解析した. OT-I 細胞を CD45.1⁺ CD8⁺ によってゲートした. 感染直後, 感染 3 日目と感染 7 日目の Kusabira Orange2 タンパク質と mAzami Green タンパク質のシグナルを示した.
- b: 感染 1 日目から 14 日目まで所属リンパ節内の OT-I 細胞と mAzami Green 陽性 OT-I 細胞の細胞数を示す.

クに減少し始めた (図 2b). 次に, 感染部位である皮膚へ浸潤した OT-I 細胞の数を経時的に調べた. その結果, 感染 3 日目にはほとんど OT-I 細胞を検出されなかったが, 感染 5 日目には多くの OT-I 細胞が皮膚で検出された. 同様に VV-OVA を感染させた皮膚直下の脂肪組織にも多くの OT-I 細胞が浸潤していることが分かり, OT-I 細胞の脂肪組織への浸潤のタイミングと浸潤した細胞の数は皮膚に浸潤した OT-I 細胞と同程度だった (図 3). 以上の結果をもとに, われわれの VV-OVA 皮膚感染モデルで感染部位に移動した OT-I 細胞のその後の運命の解析は感染から 5 日目以降に感染部位に移行する

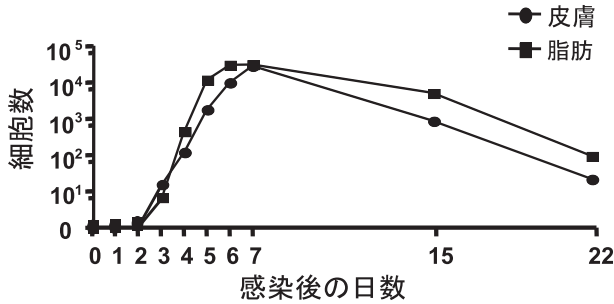


図3 感染部位に浸潤する抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞 B6 マウスに VV-OVA (1×10^5 PFU) のスクラッチによる感染の一日前に OT-I CD45.1 マウスから分離した CD8 陽性 kaede OT-I CD45.1 細胞 (1×10^6 個) を静脈注射によって移入した。感染 1 日目から 8 日目、15 日目、22 日目の皮膚内のリンパ球 (●) と感染させた皮膚直下の脂肪内のリンパ球 (■) を抗 CD45.1 抗体で検出した細胞数を示す (n = 1)。

OT-I を調べることにした。また、この実験系では、感染 7 日目までを増殖期、感染 5 日目から 20 日目までを収縮期、それ以降をメモリー T 細胞維持期とした。

2. 感染部位からの抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の移動

ウイルス感染後の T 細胞増殖、収縮期には CD8 陽性 T 細胞は皮膚内で動き回っており、メモリー T 細胞維持期では CD8 陽性 T 細胞は皮膚内で動きを止めることが知られている¹⁵⁾。このことから、増殖・収縮期には皮膚内に浸潤した CD8 陽性 T 細胞がリンパ節に移動する事が考えられる。そこでウイルス感染時に感染部位に浸潤した OT-I 細胞のリンパ節への移動の有無とタイミングを調べるために、C57BL/6 (CD45.2) マウスに OT-I/Kaede/CD45.1 細胞を移入し、VV-OVA を皮膚感染させた。感染 7 日目、14 日目と 21 日目のそれぞれの時期に感染部位に光照射を行い、感染部位に浸潤していた Kaede OT-I 細胞を光変換させた (図 4)。光照射直後には皮膚と脂肪組織内に存在する 100% の OT-I 細胞が Kaede Red であったのに対して、光照射から 24 時間後の感染 8 日目の感染部位である皮膚の OT-I 細胞は約 50% が Kaede Red 陽性、感染皮膚直下の脂肪組織内の OT-I 細胞の約 30% が Kaede Red 陽性だった (図 4)。このことから、感染 7 日目の皮膚に浸潤した OT-I 細胞の約 50% と感染皮膚直下の脂肪組織内の OT-I 細胞の約 70% が 24 時間

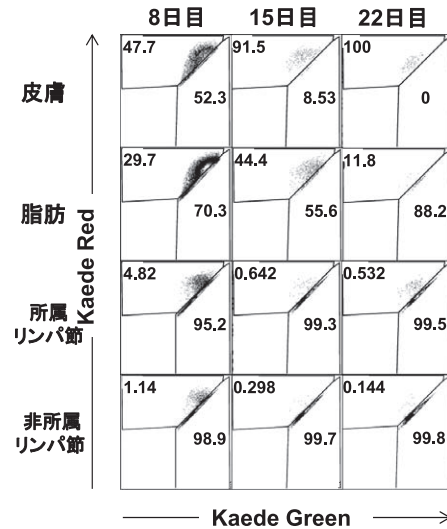


図4 抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の感染部位からの移動 B6 マウスを VV-OVA (1×10^5 PFU) のスクラッチによる感染の一日前に Kaede/OT-I/CD45.1 マウスから分離した CD8 陽性 Kaede/OT-I/CD45.1 細胞 (1×10^6 個) を静脈注射によって移入した。感染後 7、14 もしくは 21 日目のマウスを感染部位に 435 nm の光を照射した。光照射から 24 時間後に感染部位とリンパ節内の OT-I 細胞をフローサイトメーターによって解析し、Kaede Red 陽性 OT-I 細胞と Kaede Green 陽性 OT-I 細胞の割合を示す。

で感染部位の皮膚から外へ移出したことが分かった。そして、感染 7 日目において感染部位で光変換した Kaede Red 陽性 OT-I 細胞は所属リンパ節をはじめ全身のリンパ組織で検出する事ができた (図 4)。一方、感染 14 日目には感染部位である皮膚に浸潤している OT-I 細胞は約 90% の細胞が皮膚に留まり、感染 21 日目には約 100% の細胞が皮膚に留まり入れ替わりは起こっていなかった。しかし、感染 14、21 日目ともに感染皮膚直下の脂肪内に浸潤する OT-I 細胞は 50% 以上 Kaede Green 陽性細胞と入れ替わっていた (図 4)。従って、増殖期に感染部位に居る OT-I 細胞の感染部位で死滅するのでは無く、一部は TRM としてその場に留まり、一部はリンパ節に移動している事が分かった。

3. 感染部位から移動する抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の性状

感染部位に浸潤した OT-I 細胞が所属リンパ節に移動している事が分かったので、次にこれら感染部位から所属リンパ節に移動した OT-I 細胞のフェノタイプを調べた。B6 マウスに OT-I/Kaede CD45.1 細胞を移入し、VV-OVA を皮膚感染させた。そし

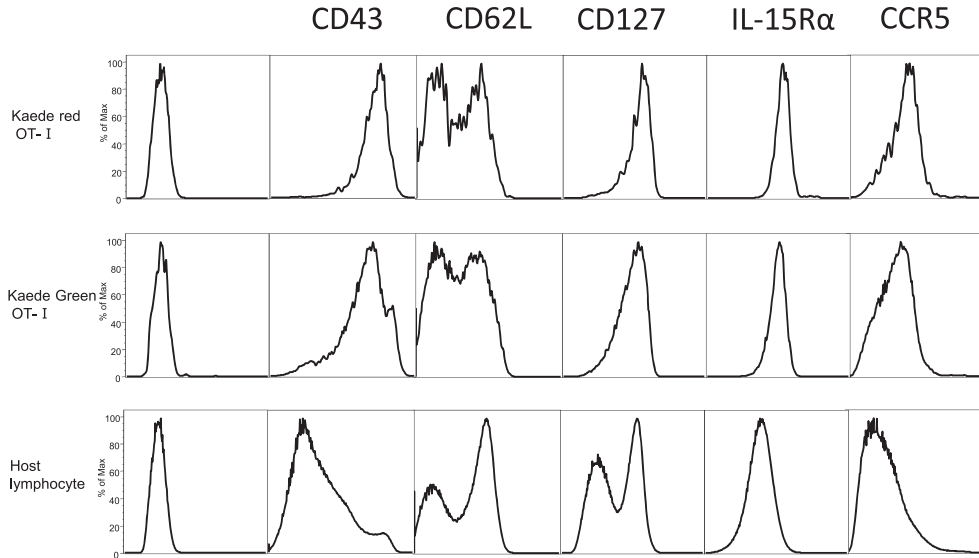


図 5 感染部位から所属リンパ節に移動する抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞のフェノタイプ
B6 マウスを VV-OVA (1×10^5 PFU) のスクラッチによる感染の一日前に kaede OT-I CD45.1 マウスから分離した CD8 陽性 kaede OT-I CD45.1 細胞 (1×10^6 Cells) を静脈注射によって移入した。感染後 7 日目のマウスの感染部位に 435 nm の光を照射した。光照射から 24 時間後の所属リンパ節のリンパ球を抗 CD43 抗体、抗 CD62L 抗体、抗 CD127 抗体、抗 IL-15R α 、抗 CCR5 抗体抗体で染色後、フローサイトメーターで解析した。(Kaede Red 陽性 OT-I (上段), Kaede Green 陽性 OT-I (中段), ホストリンパ球 (下段))

て、感染 7 日目の感染部位に光照射を行い、24 時間後に所属リンパ節へ移動した Kaede Red 陽性 OT-I 細胞のフェノタイプを調べた (図 5)。その結果、CD62L^{low} の TEM 様な OT-I 細胞と CD62L^{high} の TCM 様な OT-I 細胞は Kaede Red 陽性細胞と Kaede Green 陽性細胞ともに同程度だった。しかし、CD43、CD127、IL-15R α と CCR5 の発現は Kaede Green 陽性 OT-I 細胞に比べて Kaede Red 陽性 OT-I 細胞の方が発現は高いことから感染部位から所属リンパ節に移行した OT-I 細胞は、リンパ節内の resident OT-I 細胞と比べてメモリー T 細胞として維持されやすい性状を示していた。

4. 感染部位から移動した抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の運命

感染部位からリンパ節に移動する OT-I 細胞の細胞数と長期生存を調べるために、B6 マウスに OT-I/Kaede CD45.1 細胞を移入し、VV-OVA を皮膚感染させた。感染 6 日目から 8 日目の間 12 時間毎に計 4 回感染部位に光照射を行い、この期間に感染部位に浸潤していた OT-I 細胞の生存期間を調べた (図 6)。その結果、最後の光照射から 12 時間後には全身のリンパ組織、末梢組織で Kaede Red 陽

性 OT-I 細胞を検出する事が出来、全身で検出される OT-I 細胞の約 10% が Kaede Red 陽性 OT-I 細胞であり、リンパ節より、肝臓や肺など、末梢組織で高い割合を占めていた (図 6)。そして感染から 15 日目においても感染部位を経由した Kaede Red 陽性 OT-I 細胞を各組織内で検出する事ができた。メモリー T 細胞維持期の 22 日目においても割合は少ないが Kaede Red 陽性 OT-I 細胞を各組織内で検出する事が出来た。

従って、ウイルス感染時に感染部位へ移動したウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞は TRM 細胞だけでなく、メモリー T 細胞としてリンパ節や全身の組織で維持されている事が分かった。

5. 所属リンパ節から移動する抗原特異的 CD8 陽性メモリー T 細胞

増殖・収縮期には、感染部位を経由したウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞がリンパ節内に多く存在し、メモリー T 細胞として生き残る事が分った。次にメモリー T 細胞維持期の所属リンパ節に存在するウイルス特異的メモリー T 細胞の移動を調べた。B6 マウスに OT-I/Kaede CD45.1 細胞を移入し、VV-OVA を皮膚感染させ後、30 日目の所属リンパ

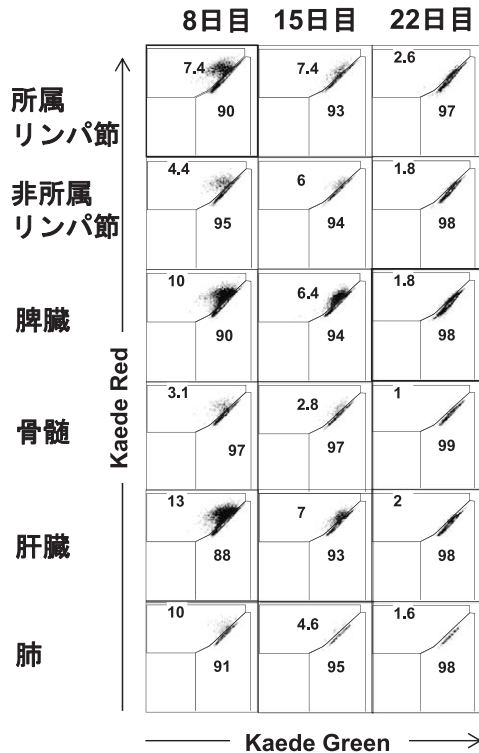


図 6 増殖・収縮期に感染部位から他の組織に移動する抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の運命

B6 マウスに VV-OVA (1×10^5 PFU) のスクラッチによる感染の一日前に kaede OT-I CD45.1 マウスから分離した CD8 陽性 kaede OT-I CD45.1 細胞 (1×10^6 個) を静脈注射によって移入した。感染後 6 日目のマウスを 12 時間おきに計 4 回感染部位に 435 nm の光を照射した。b 最後の光照射から 12 時間後 (感染 8 日目), 7 日後 (感染 15 日目) もしくは 14 日後 (感染 22 日目) のリンパ組織あるいは末梢組織にいる, OT-I 細胞をフローサイトメーターによって解析し, Kaede Red 陽性 OT-I 細胞と Kaede Green 陽性 OT-I 細胞の割合を示す。

節である鼠径リンパ節に光照射を行った。そして、24 時間後に所属リンパ節内の OT-I 細胞の入れ替わりと他のリンパ組織への移動を調べた。所属リンパ節において、約 75% の OT-I 細胞が入れ替わり、感染から 30 日目の所属リンパ節に存在した OT-I 細胞は全身のリンパ節だけでなく骨髄内にも移動していた (図 7a)。CD69 分子は T 細胞のリンパ節での入れ替わりの制御に関与しており⁷⁾、また、I 型インターフェロンのシグナルは CD69 の発現誘導介してリンパ球がリンパ節から移動するために必須なスフィンゴシン 1 リン酸レセプター 1 (S1P1) の発現をダウレギュレーションすることが知られている¹⁶⁾。そこで、この CD69 の発現を所属リンパ節内

の TCM と TEM OT-I 細胞で調べた。その結果、TEM の方が TCM より CD69 を強く発現している OT-I 細胞の割合が高い事が分かった (図 7b)。以上の結果から、メモリー T 細胞維持期には、リンパ節内のメモリー T 細胞は常に入れ替わっており骨髄を含む全身のリンパ節内で維持されている事が分かった。また、入れ替わりの速度は CD62L の発現には依存せず、CD69 の発現が重要である事が分かった。

考 察

ウイルス感染後の T 細胞増殖、収縮期に感染部位である皮膚とその直下の脂肪組織に多くのウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞の浸潤が起こり、それらの一部が所属リンパ節を介して、全身に循環していた。これら所属リンパ節を経由したウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞は特徴のあるフェノタイプを示し、メモリー T 細胞として長期間維持される事が分かった。また、メモリー T 細胞維持期には感染部位である皮膚では入れ替わりが起こらなくなるが (図 6)、リンパ節間では多くのメモリー T 細胞が入れ替わり移動する事が分かった (図 7)。

VV-OVA の皮膚感染モデル実験においてウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞は、皮膚だけでなく皮膚直下の脂肪組織内にも多くの浸潤が見られた。当研究において感染部位への光照射は感染部位である皮膚内の Kaede OT-I 細胞だけでなく皮膚直下の脂肪組織内の Kaede OT-I 細胞も同時に光変換している。そのため所属リンパ節内に移動してきた Kaede Red 陽性 OT-I 細胞が感染した皮膚から来たのか、直下の脂肪組織から来たのか明確にすることはできなかった。しかし、増殖、収縮期において皮膚および脂肪組織内の OT-I 細胞も入れ替わっていることから、ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞は皮膚と脂肪組織いずれからも所属リンパ節に移動している事が示唆された。また、肥満マウスにおいて脂肪組織に CD8 陽性エフェクター T 細胞が正常なマウスより多く浸潤することが知られており¹⁷⁾、脂肪組織も T 細胞に関与があることが予想される。今回の結果は、これら感染部位から所属リンパ節に移行した Kaede Red 陽性 OT-I 細胞が Kaede Green 陽性 OT-I 細胞と異なるフェノタイプを示すことから脂肪組織がメモリー T 細胞形成に影響することが示唆さ

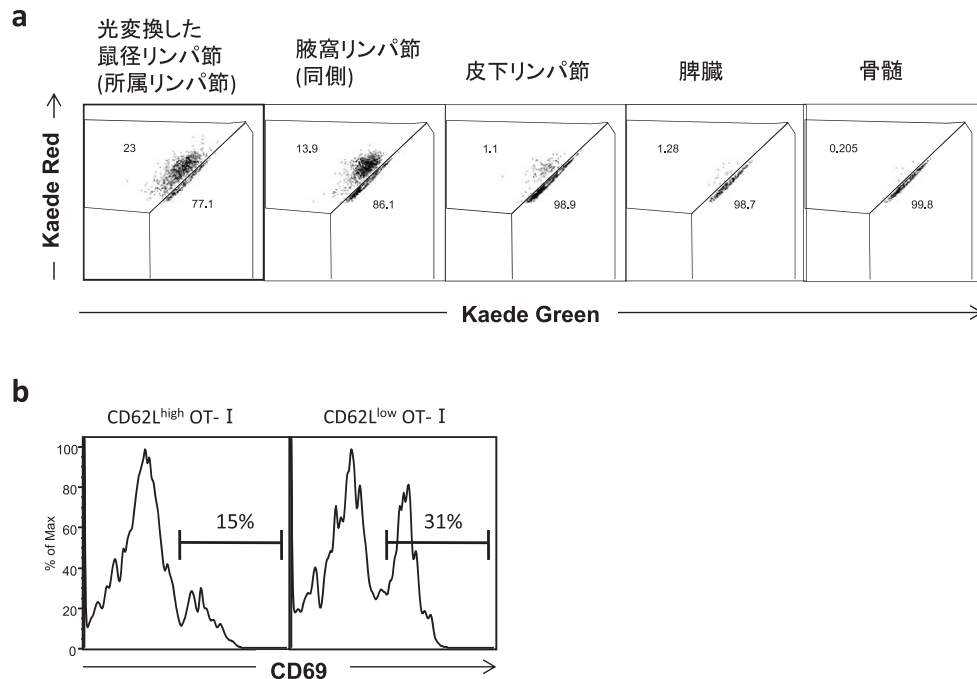


図 7 メモリー期における抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の所属リンパ節からの移動

- a: B6 マウスに VV-OVA (1×10^5 PFU) のスクラッチによる感染の一日前に kaede OT-I CD45.1 マウスから分離した CD8 陽性 kaede OT-I CD45.1 細胞 (1×10^6 個) を静脈注射によって移入した。感染後 27 日目から 40 日目のマウスの所属リンパ節 (2 つあるうちのどちらか一方 (図 2-b)) に 435 nm の光を照射した。光照射から 24 時間後の所属リンパ節をはじめ各リンパ組織のリンパ球をフローサイトメーターによって解析し、Kaede Red 陽性 OT-I 細胞と Kaede Green 陽性 OT-I 細胞の割合を示す。
- b: 感染 27 日目から 40 日目のマウスの所属リンパ節内のリンパ球を抗 CD62L 抗体と抗 CD69 抗体で染色後、フローサイトメーターによって解析した。CD62L^{high} と CD62L^{low} の OT-I 細胞の CD69 シグナルをヒストグラムで示す。

れた。

感染部位から所属リンパ節に移行した OT-I 細胞は、リンパ節内の resident OT-I 細胞と比べ、メモリー T 細胞のメンテナンスに重要な IL-7, IL-15 のレセプターである CD127, IL-15R α の発現が高いことから (図 5), メモリー T 細胞として生き残りやすい可能性が示唆された。また、感染部位から所属リンパ節に移動した細胞は炎症状態の皮膚や脳への浸潤に関与する CD43 や^{18,19)}、肺への浸潤に関与する CCR5 の発現が高いため²⁰⁾、リンパ節よりも肺や肝臓に浸潤しやすく、Kaede Red 陽性 OT-I 細胞の割合がリンパ節に比べ肺や肝臓で高い割合を示した可能性が考えられる (図 4)。このことから、感染部位はウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞のメモリー T 細胞形成、末梢組織へ移動するための能力の獲得に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかし、今回の実験では感染部位が T 細胞に能力を獲

得させたのか、能力を獲得した T 細胞が感染部位に浸潤したのかは分からない。

増殖・収縮期に感染部位に浸潤したウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞は長期にわたって全身の組織で観察することができた。しかし、実験に使用した Kaede タンパク質は光変換によって赤色の蛍光タンパク質に変換されるが、これら赤色の蛍光タンパク質は分裂とともに半減すると共に、時間とともに代謝され新しく産生される緑色の Kaede タンパク質に置き換わる。今回、光照射をした期間には OT-I 細胞の分裂がほとんど起こっていないことを確認している。しかし、感染 22 日目に行った解析は光照射から 14 日間と長い時間が経過しているため Kaede Red のタンパク質の多くは代謝されている事が予想される。また実験では感染 6 日目から 8 日目まで計 4 回、感染部位に光照射を行ったが、光照射した期間の後にも多くの OT-I 細胞が浸潤していると考え

られる。このように Kaede Red タンパク質の代謝、光照射期間外の浸潤そして、感染部位を経由する OT-I 細胞がメモリー T 細胞として維持されやすい性状を示していた事を考慮すると、全身で検出される OT-I 細胞のなかで Kaede Red 陽性 OT-I 細胞は 22 日目で約 2% しか検出できなかったが、8 日目で観察した 10% よりも高い割合で生存し続けている事が示唆される。

メモリー T 細胞維持期のウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞は、全身のリンパ節間を移動しながら維持されている事が分かった。メモリー T 細胞は CD69 が発現するとリンパ節から移動できなくなる。また CD69 は活性化マーカーとしても知られている。メモリー T 細胞を長期間維持していると考えられている骨髄や TRM を長期間維持している皮膚など末梢の組織に存在するメモリー T 細胞は CD69 を発現している細胞の割合が高い^{9,21)}。また、骨髄では免疫細胞を長期維持するための微小環境(ニッチ)が存在すると考えられている²¹⁾。このことから、リンパ節内にメモリー T 細胞、特に TEM に何らかの刺激を与え、CD69 を発現させるニッチが存在する事が考えられる。そして、リンパ節内のニッチはメモリー T 細胞に CD69 を発現させる事によってニッチの近くにメモリー T 細胞を停滞させて、メモリー T 細胞に必要なメンテナンスを行っていると考えられる。

これらの結果から、メモリー T 細胞の形成過程において、感染部位はメモリー T 細胞としての維持に必要なサイトカイン受容体の発現を誘発する事が示唆された。さらに、メモリー T 細胞の維持過程においてはリンパ節内にメモリー T 細胞を維持するニッチが存在する可能性を示した。そして、メモリー T 細胞は常にリンパ節間を循環しながらこれらリンパ節内のニッチによって維持されていると考えられる。従って、メモリー T 細胞は常にリンパ節間を動いているため、局所に存在する細胞を観察するだけでなく、その細胞が以前どのような組織に居て、どのような刺激を受けて来たか、細胞の経歴を知る事がメモリー T 細胞形成・維持の解明に重要である事が考えられる。

謝辞 本研究において、研究材料の提供と助言を頂いた、東京大学医学部大学院医学系研究科分子予防医学松島綱

治教授をはじめ、倉知慎先生、上羽悟史先生、阿部淳先生、研究室の皆様により感謝申し上げます。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:251-262.
- 2) Wakim LM, Waithman J, van Rooijen N, *et al.* Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science.* 2008;319:198-202.
- 3) Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, *et al.* Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:137-161.
- 4) Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:749-761.
- 5) Henrickson SE, Perro M, Loughhead SM, *et al.* Antigen availability determines CD8+ T cell-dendritic cell interaction kinetics and memory fate decisions. *Immunity.* 2013;39:496-507.
- 6) Liu L, Zhong Q, Tian T, *et al.* Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat Med.* 2010;16:224-227.
- 7) Tomura M, Itoh K, Kanagawa O. Naive CD4+ T lymphocytes circulate through lymphoid organs to interact with endogenous antigens and upregulate their function. *J Immunol.* 2010;184:4646-4653.
- 8) Sheridan BS, Lefrancois L. Regional and mucosal memory T cells. *Nat Immunol.* 2011;12:485-491.
- 9) Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, *et al.* The developmental pathway for CD103(+) CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol.* 2013;14:1294-1301.
- 10) Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, *et al.* Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol.* 2012;13:499-510.
- 11) Tomura M, Yoshida N, Tanaka J, *et al.* Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:10871-10876.

- 12) Jiang X, Clark RA, Liu L, *et al.* Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature*. 2012;**483**:227-231.
- 13) Tomura M, Sakaue-Sawano A, Mori Y, *et al.* Contrasting quiescent G0 phase with mitotic cell cycling in the mouse immune system. *PLoS One*. 2013;**8**:e73801.
- 14) Kedl RM, Rees WA, Hildeman DA, *et al.* T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J Exp Med*. 2000;**192**:1105-1113.
- 15) Gebhardt T, Whitney PG, Zaid A, *et al.* Different patterns of peripheral migration by memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Nature*. 2011;**477**:216-219.
- 16) Shiow LR, Rosen DB, Brdickova N, *et al.* CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*. 2006;**440**:540-544.
- 17) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, *et al.* CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009;**15**:914-920.
- 18) Matsumoto M, Shigeta A, Furukawa Y, *et al.* CD43 collaborates with P-selectin glycoprotein ligand-1 to mediate E-selectin-dependent T cell migration into inflamed skin. *J Immunol*. 2007;**178**:2499-2506.
- 19) Onami TM, Harrington LE, Williams MA, *et al.* Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J Immunol*. 2002;**168**:6022-6031.
- 20) Galkina E, Thatte J, Dabak V, *et al.* Preferential migration of effector CD8⁺ T cells into the interstitium of the normal lung. *J Clin Invest*. 2005;**115**:3473-3483.
- 21) Shinoda K, Tokoyoda K, Hanazawa A, *et al.* Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;**109**:7409-7414.

VIRAL-SPECIFIC CD8-POSITIVE EFFECTOR T CELLS DIFFERENTIATED TO MEMORY T CELLS ARE MAINTAINED IN LYMPH NODES

Akihiro HATA and Kazuo TANAKA

Department of Microbiology, Showa University School of Medicine

Michio TOMURA

Center for Innovation in Immunoregulative Technology and Therapeutics, Kyoto University
Graduate School of Medicine

Abstract — Viral-specific memory T cells are divided into central memory T cells (TCM), effector memory T cells (TEM) and resident memory T cells (TRM) according to function and localized characteristics. Differentiation and maintenance of these memory T cells require the viral antigen and some type of cytokines. However, it is not known how these viral-specific memory T cells receive stimulation. As it is thought that the viral antigen and inflammatory cytokines are present in the viral infected site. The infection site plays a role in the differentiation of the memory T cells. We used a skin infection model of ovalbumin (OVA)-recombination vaccinia virus (VV-OVA), OT-I, Fucci and Kaede mice to prove this hypothesis. From the experimental results, the virus-specific CD8-positive T cells in the infection skin migrated to the draining lymph node, where they expressed memory T cell phenotype. Therefore, it was suggested that the infection site was important for the expression of the cytokine receptors, which was necessary for maintenance of memory T cells. In addition, the memory T cells moved between lymph nodes in the maintenance phase. Thus, it is thought that more memory T cells can receive stimulation, which is necessary for maintenance, by migrating between the lymph nodes. In conclusion, the infection site and lymph nodes are both important for the generation and maintenance of viral-specific memory T cells.

Key words: memory T cells, viral infection

[受付 : 1 月 21 日, 受理 : 2 月 5 日, 2014]